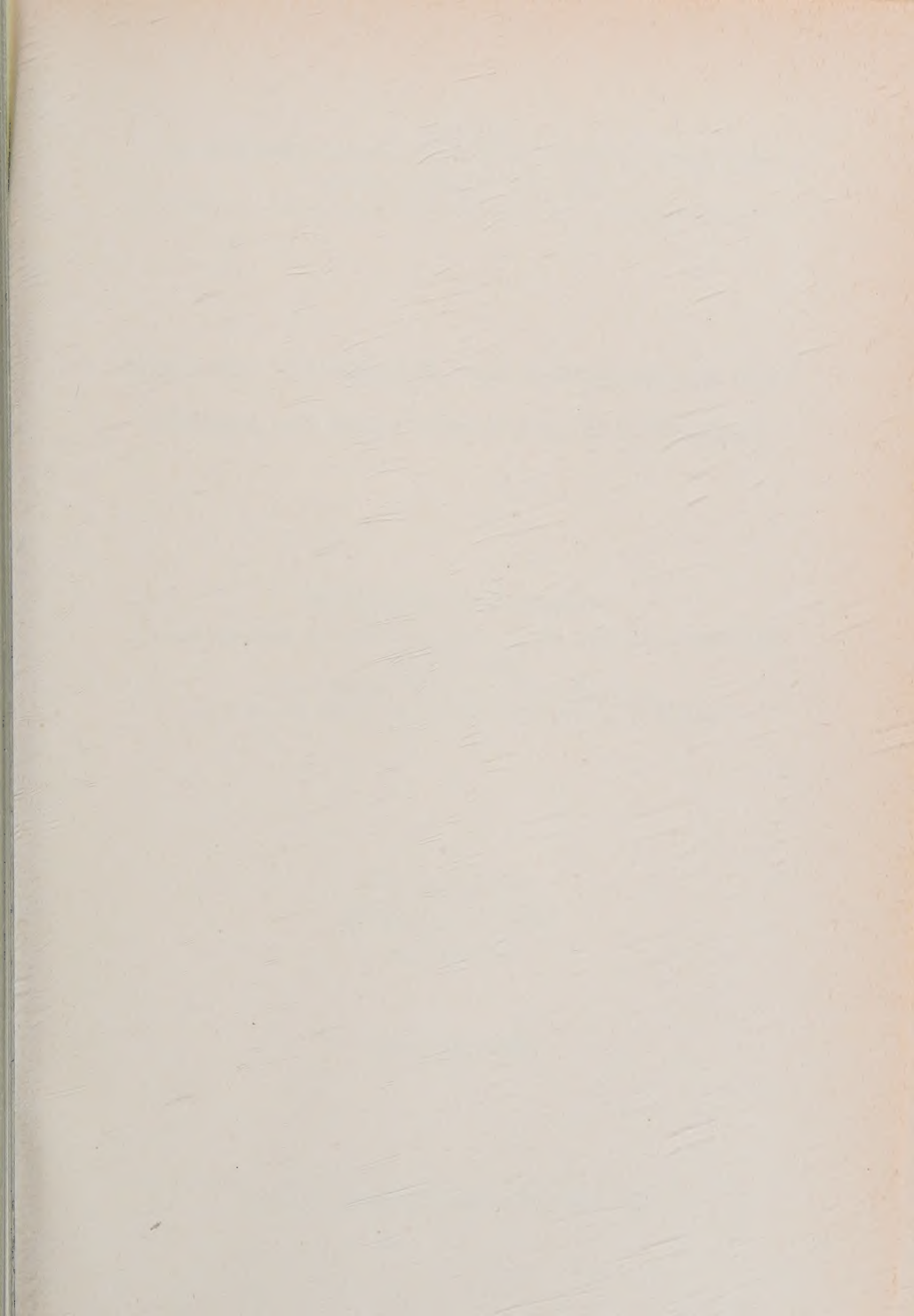


München, 1960.

**Über die Extraktion
von Lipoiden aus dem Plasma
mit Hilfe von Äther und Triolein**

Helmut Strehle



AUS DER
MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor : Professor Dr. W. Seitz

**Über die Extraktion von Lipoiden aus dem
Plasma mit Hilfe von Äther und Triolein**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

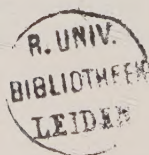
vorgelegt von
Helmut Strehle
aus München

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Privatdozent Dr. N ZÖLLNER
Correferent: Professor Dr. W. SEITZ
Dekan: Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 5.4.1960



GEWIDMET
MEINEN LIEBEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555220_0105

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Vorwort	7
Chemie und Vorkommen des Cholesterins	7
Stoffwechsel des Cholesterins	8
Chemie und Vorkommen der Phosphorlipide	9
Stoffwechsel der Phosphorlipide	9
Cholesterin und Phosphorlipide	11
Methodik	13
Ergebnisse	20
Auswertung der Ergebnisse	31
Diskussion	32
Zusammenfassung	33
Literaturverzeichnis	36

V O R W O R T

Unter Lipoiden versteht man im Gegensatz zu den Neutralfetten "fettartige Substanzen". Sie alle bestehen aus Fettsäure, einem Alkohol und meistens aus einer oder mehreren weiteren Gruppen, wie Phosphatester, organischen Basen, Aminosäuren, Zuckern, langkettigen Aldehyden usw. Natürlich und alle Lipoide erfassend wäre die Einteilung nach Carter (1), nach der Natur des in jedem Lipoid enthaltenen Alkohols.

Für die Fragestellung geeigneter und auch allein durch die Bestimmungsmethoden schon vorgezeichnet ist eine andere Einteilung. Danach unterscheidet man phosphorhaltige Lipoide, die Phosphorlipide oder Phosphatide (wie Lecithin, Cephalin, Azetalphosphatide, Sphingomyelin, Serinphosphatide), zuckerhaltige Lipoide (wie Zerebroside und Ganglioside) und Sterine (wie Cholesterin). Zu diesem Thema interessieren Cholesterin und Phosphorlipide.

CHEMIE UND VORKOMMEN DES CHOLESTERINS

Der Formel nach leitet sich Cholesterin vom Sterangerüst ab. Es ist 3(β)-Oxycholesten-($\Delta^{5,6}$)BC,CD-trans. In Wasser- und Salzlösungen ist Cholesterin unlöslich, dagegen etwas in Seifenlösungen oder in Lösungen gallensaurer Salze (2).

Sucht man nach der Verbreitung des Cholesterins im Körper, so findet man es hauptsächlich in den Zellstrukturen. Dieses Zellcholesterin, das vorwiegend in der freien Form vorliegt und bei Kostveränderungen und Unterernährung zäh festgehalten wird, spielt vermutlich in den Membranen eine wesentliche Rolle. An Organen weisen vor allem die Leber, das Gehirn, die NNR, der Darm und die Lunge einen hohen Cholesteringehalt auf.

Ein geringerer Teil des Körpercholesterins ist im Serum gelöst. Teils ist es mit Fettsäuren verestert, das sog. Estercholesterin, oder es liegt in der unveresterten Form vor, das sog. freie Cholesterin. Der durchschnittliche Gehalt an Estercholesterin beträgt ca. 120 mg %, an freiem Cholesterin ca. 80 mg %.

STOFFWECHSEL DES CHOLESTERINS

Entsprechend dem Vorkommen des Cholesterins zeigt auch sein Stoffwechsel im Blut und im Gewebe Unterschiede.

Ins Blut gelangt das Cholesterin exogen durch Resorption im Darm über die Lymphgefäße teils direkt, hauptsächlich jedoch über den ductus thoracicus (täglich ca. 1,5 - 1,8 g). Da Cholesterin auch endogen gebildet wird und, wie Versuche zeigten (3), der Gehalt der Leber an markiertem Cholesterin nach der Synthese schnell abnimmt, muß ein direkter Austausch der Moleküle zwischen Leber und Blut bzw. anderen Geweben angenommen werden. Am schnellsten erfolgt nach Acetatverabreichung der Ausgleich von freiem Cholesterin im Leber-Plasma-System, etwas langsamer im Plasma-Erythrozyten-System, am langsamsten zwischen freiem Cholesterin des Plasmas und Cholesterinestern in den Erythrozyten. Ausgeschieden wird Cholesterin mit der Galle und zwar mehr als resorbiert; es wird also auch synthetisiertes Cholesterin ausgeschieden, jedoch das ausgeschiedene teilweise wieder resorbiert (1,9 - 2,2 g). Ist schon das Serumcholesterin eine stabile Größe, so gilt das noch mehr vom Cholesterin der Zelle.

Teils gelangt es dorthin exogen aus dem Blut, teilweise wird es in der Zelle synthetisiert (5). Als Hauptbildungsstätten wurden vor allem die Leber, aber auch die NN, der Darm, die Haut und im Tierversuch das jugendliche Gehirn entdeckt (4). Auf der zellulären Ebene betrachtet sind vor allem Reticulumzellen und Histozyten gute Cholesterinbildner (5), vermutlich jede wachsende Zelle (5), also auch Blastome des Gehirns, wie Versuche zeigten (6). So sind z. B. die Reticulozyten und die Normoblasten zur Cholesterinsynthese befähigt (7), dagegen nicht die Normozyten. Der Aufbau kann erfolgen aus Acetat (8), Squalen (9), und Mevalonat (4). Nach ZÖLLNER (10,5) ist Squalen bereits als ein Zwischenprodukt der Synthese anzusehen, das aus Acetat (besser 3 Acetyl-CoA) über β -Hydroxy- β -methylglutarsäure und schließlich über β -Methylcrotonsäure entsteht. F. LYNEN, H. EGGER, U. HENNING und I. KESSEL (11) fanden, daß rohe Hefeextrakte, ergänzt mit ATP, TPNH, und Mg^{++} aus Mevalonsäure Squalen bilden, wobei zunächst 5-Phosphomevalonsäure entsteht. Läßt man TPNH fort und gibt den Ansätzen m/200 Jodacetat zu, reichert sich Isopentenylpyrophosphat an, das sich durch die Enzyme der Leber in Cholesterin umwandeln ließ (11). Eine Hemmung der endogenen Cholesterinsynthese gelang erstmals COTTET, REDEL, KRUMMHELLER und TRICAUD mit Natriumphenyl-äthyl-acetat. Der Grund dafür ist wahrscheinlich eine kompetitive Hemmung der Azetessigsäure (13). Neuerdings wurden mit 1-Histidin bessere Erfolge erzielt (14). Auch durch Erhöhung der Oxydationsprozesse durch Zufuhr (15) von Cytochrom C, oder Haematoporphyrin etc. wurde eine starke Abnahme des Cholesteringehaltes erzielt, ebenso mit Nicotinsäure (16).

Die Zelle ist jedoch auch zum Abbau des Cholesterins befähigt. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Mitochondrien der Leber die Fähigkeit haben, die endständigen Methylgruppen der Cholesterinseitenketten zu Kohlendioxyd zu oxydieren (17).

CHEMIE UND VORKOMMEN DER PHOSPHORLIPOIDE

Die Phosphorlipide sind charakterisiert durch die Anwesenheit von Phosphorsäure im Molekül. Wie oben schon erwähnt, kann man mehrere Gruppen unterscheiden, und zwar nach dem jeweilig enthaltenen Alkohol.

- a) Die Glycerinphosphatide oder Phosphorylglyceride sind Phosphorsäureester der 1,2 Diglyceride. In diese Gruppe zählen vor allem das Lezithin, das Kephalin und die Azetalphosphatide.
- b) Die Phosphorinositide konnten, was ihre Konstitution betrifft, noch nicht sicher eingereiht werden. Voraussichtlich gehören sie zu den Phosphorglyceriden.
- c) Unter den Sphingolipiden sind die wichtigsten phosphorhaltigen Vertreter die Sphingomyeline.

Sucht man nach dem Vorkommen der Phosphorlipide, so findet man sie ähnlich wie das Cholesterin als Bestandteil der Struktur und der Zellmembran. Interessant ist, daß nach PARPART (18) und BALLENTINE in den Erythrozyten die Kephaline mit 46 % der Gesamtlipide überwiegen. An Organen enthalten vor allem Leber, Gehirn, auch NN, Niere, Pankreas, nicht zu vergessen Lunge und der Ischiasnerv reichlich Phosphorlipide.

Im Serum beträgt ihr Gehalt im Durchschnitt 100 - 250 mg %. Der überwiegende Teil setzt sich aus Lezithin zusammen; Kephalin, Acetalphosphatide und Sphingomyelin stellen einen geringen Prozentsatz dar.

STOFFWECHSEL DER PHOSPHORLIPOIDE

Der Stoffwechsel der Phosphorlipide liegt noch weitgehend im Dunkeln, vor allem der der Phosphorinositide und der Sphingomyeline.

Ins Blut kann ein Teil der Glycerinphosphatide ungespalten resorbiert werden. Der Weg führt wieder über das Lymphgefäßsystem hauptsächlich über den ductus thoracicus in das venöse Blut und so in die Lunge, in der es zu einer starken Vernehrung der Gewebsphosphatide kommt (19).

Das Gewebe erhält seine Phosphorlipide aus dem Blut oder es synthetisiert sie selbst, wozu es in der Lage ist. Man findet vor allem hohe Konzentrationen an Glycerinphosphatiden dann, wenn es rasch wächst, z. B. als Tumor, oder wenn es stoffwechselmäßig aktiv ist. Endogen können, wie Isotopenversuche mit markiertem Cholin zeigten, die Glycerinphosphatide sehr rasch aus ihren Bestandteilen vollständig aufgebaut werden und zwar hauptsächlich in der Leber. Da die Synthese sehr rasch vor sich geht, nimmt man eine Reihe von Organen als Bildungsstätten an, so auch den Dünndarm und die Lunge (19). Die dazu nötigen Bausteine wie Cholinglycerin, Fettsäuren, sowie Phosphat dürften aufgrund ihres reichlichen Vorkommens im Stoffwechsel immer zur Verfügung stehen. Den klaren Beweis führten FRIEDKIN und LEHNINGER (20), als ihnen eine Phosphorlipidsynthese in isolierten Mitochondrien mit intakter Atmung, besonders bei Zusatz von Glycerin, ATP und Malat gelang.

ZÖLLNER führt 2 Reaktionsschemen an (21):



Eine Umkehrbarkeit der Reaktion zwischen Phosphatidsäure und Cholin mit Ersatz der Base ist nach ARTOM (22) eine einfache Erklärung für die Umwandlung der Phosphorlipide untereinander (23). Physiologisch scheint dem lipotropen Pankreasfaktor im Zusammenwirken mit lipotropen Nahrungsfaktoren ein bestimmter Einfluß im Sinne einer Regulierung des Phosphorlipidaustausches zuzukommen.

Eine Hemmung der Phosphorlipidsynthese in der Leber konnte, wie Versuche von SNYDER F. und CORNATZER W. E. (24) zeigten, durch intraperitoneale Gaben von Vanadium und auch durch Bestrahlung der Leber mit Vanadium erreicht werden.

Über den intrazellulären Abbau der Phosphorlipide ist außer der Tatsache, daß der Phosphorlipidgehalt von Organen bei der Autolyse abnimmt, wenig bekannt.

Über den Stoffwechsel der Phosphorinositide und des Sphingomyelins ist wenig bekannt. Das in der Zelle enthaltene Sphingomyelin ist normalerweise außergewöhnlich stabil und kann durch Ernährung nicht ohne weiteres verändert werden (25). Die Serumkonzentration beträgt ca. 20 mg %.

CHOLESTERIN UND PHOSPHORLIPOIDE

Wenn wir das Zusammenspiel zwischen Cholesterin und Phosphorlipoiden betrachten, so fällt uns auf, daß mit jeder Hypercholesterinämie regelmäßig auch eine Hyperphosphorlipoidämie verbunden ist (26, 29). Bei Leberkrankheiten z. B. verhalten sich die Serumphosphorlipoide wie das Cholesterin. Gallestauung führt zum Anstieg und zwar mit der Dauer der Stauung zunehmend (27). Früher glaubte man, der Grund liege in einer "allgemeinen Störung des Lipidstoffwechsels".

Heute weiß man aber, daß die Stoffwechselwege von Phosphorlipoiden und Cholesterin sich weder bei der Synthese noch beim Abbau eng berühren (28). Betrachtet man den Quotienten aus den Konzentrationen von Gesamtcholesterin und Phosphorlipoiden, so besteht eine lineare Beziehung zwischen den Logarithmen der Konzentrationen von Phosphorlipoiden und Cholesterin (29).

Auffällig sind auch Befunde, daß wie schon erwähnt Vanadiumgaben und Vanadiumbestrahlungen die Phosphorlipoidsynthese hemmen. Gleichzeitig läßt sich durch orale Vanadiumgaben die Cholesterinbiosynthese in menschlichen Tumoren wie Glioblastoma multiforme, Astrozytoma, Meningiome, Neurofibrome usw. drosseln (6). In gleiche Richtung weist, daß unter Einfluß des Lipocaic-Faktors sowohl Phosphorlipoide als auch Cholesterin, also nicht nur eines der beiden Lipide, in der Leber mobilisiert werden.

Noch aufschlußreicher sind Analysen, die nach Ultrazentrifugierung von Seren aus den verschiedenen Fraktionen mit verschiedener Dichte gemacht wurden. Es ergaben sich 4 Fraktionen, von denen die erste aus Chylomikronen bestand, die anderen 3 aus Lipoproteinen verschiedener Dichte. Das Ergebnis der Analyse war, daß in allen 4 Fraktionen außer Eiweiß und Glycerinester sowohl Cholesterin als auch Phosphorlipoide enthalten waren. Ihre Menge verlief immer proportional zueinander, allerdings auch proportional zu den Proteinen (30). Will man diese Befunde deuten, so müßte man am besten die physikalisch-chemischen Mechanismen, die die Lipide in Lösung halten, untersuchen. Es wäre zu fragen, warum eine Vermehrung des einen Lipoids eine Vermehrung des anderen nach sich zieht, nachdem, wie schon oben erwähnt, feststeht, daß ihr Stoffwechsel wenig Gemeinsamkeit besitzt.

Bekannt ist, daß in normalen Seren bis zu 700 mg % Lipide gelöst sein können. Die gleiche Menge könnte im gleichen Volumen Wasser ohne Trübung nicht aufgenommen werden. Das Serum jedoch ist klar. Irgend ein Bestandteil im Serum muß also die Lösung vermitteln. MACHEBOEUF konnte schon früh im Serum Niederschläge erzeugen, die Proteine und dazu konstante Mengen Lipide enthielten.

Auch bei der Elektrophorese wandern unter gleichen Bedingungen die Lipide immer mit denselben Globulinen, nämlich mit den α_1 - und β -Globulinen (3). Wird jedoch das Milieu eiweißreicher, wandern sie mit anderen Proteinen und zwar mit Albuminen.

COHN E. J., sowie ONCLEY und Mitarbeiter (32, 33) gelang die Isolierung und Reinigung von α_1 - und β -Lipoproteinen durch Fraktionierung aufgrund unterschiedlicher Löslichkeit.

Vor allem aber mit der Ultrazentrifuge konnten, wie oben schon erwähnt, die Serumlipoproteine in 3 Fraktionen aufgeteilt werden, wovon jede eine bestimmte Menge Eiweiß und dazu eine proportional bestimmte Menge Lipide enthielt.

Es stellt sich nun die Frage, warum die Lipide im Serum gelöst sind, ob dabei vielleicht eine "Bindung" an Proteine stattfindet und vor allem, welcher Art diese Bindung ist. Wäre z. B. die Bindung zwischen Protein und Phosphorlipiden kovalent, müßte an eine Bindung zwischen Aminosäuren und den Basen der Phosphorlipide gedacht werden und könnte durch die Isolierung eines Dipeptid-phosphorylglycerins oder einer entsprechenden Substanz bewiesen werden, die aber bis jetzt noch nicht aufgefunden worden ist. Wenn es eine lockere Aggregatbildung wäre, müßte es möglich sein, mit Hilfe eines gegen Eiweiß indifferenten nichtpolaren Lösungsmittels Lipide aus dem Serum bei guter Durchmischung beider Stoffe quantitativ zu extrahieren.

Meine Versuche galten dem Zweck, festzustellen, ob mit Hilfe eines Eiweiß nicht denaturierenden Lösungsmittels, nämlich Triolein bzw. Äther die Lipide des Serums speziell in diesem Fall Phosphorlipide und Cholesterin quantitativ extrahiert werden können.

M E T H O D I K

Extraktion von Lipoiden aus dem Plasma
mit Hilfe von Äther bzw. Triolein

Versuchsanordnung:

Grundgedanke: Um einen möglichst großen Teil von Lipoiden aus dem Blutserum ohne Eiweißausfällung zu extrahieren, gibt man zu einer bestimmten Menge bzw. zu einem bestimmten Gewicht von Blutserum ein gegen Eiweiß möglichst indifferentes Extraktionsmittel, in unserem Fall Triolein bzw. Äther. Dann wird durch Rühren mit einem Glasstab bzw. durch Schütteln in der Warburg-Apparatur Blutserum mit dem Lösungsmittel kräftig durchmischt und anschließend versucht, die beiden Substanzen möglichst vollständig wieder zu trennen, um im Serum- und im Triolein- bzw. Äther-Teil den Cholesterin- und Phosphorlipidgehalt sowie in der Serumphase das Gesamteiweiß zu bestimmen.

Ausführung:

I. Extraktion mit Triolein:

Blut wird mehrmals zentrifugiert und die obere Serumschicht abpipettiert. Davon gibt man in ein großes dickwandiges Zentrifugenglas ca. 100 ccm bzw. 100 g, dazu mengen- oder gewichtsmäßig 1/3 Triolein. Hierauf werden die beiden Flüssigkeiten mit einem Glasrührer, der mittels eines Elektromotors angetrieben wird, kräftig 2 Std. lang durchmischt. Anschließend wird das Gemisch 20 Min. lang bei etwa 3 000 Umdrehungen/min. zentrifugiert und dann das Zentrifugenglas in Eis eingebettet und so lange in den Eisschrank gestellt, bis die oben schwimmende Trioleinschicht hart geworden ist. Diese wird entweder vorsichtig abgehoben oder die Serumschicht wird in ein anderes Zentrifugalglas abgegossen, wobei mit einem Löffel die Trioleinschicht zur Seite gehalten wird. Die auf der Serumschicht eventuell schwimmenden Trioleinteile werden mit einer Kapillare abgesaugt und von dem Serum 1 ccm zur Cholesterin- und 2 ccm zur Phosphorlipoid-Bestimmung wie später beschrieben gefällt. (Es wurde zur genaueren Trennung später nochmals eine Zentrifugierung bei 24 000 g eingeschaltet und zwar von 2 x 5 ccm. Mittels einer Kapillare

14

wurde das oben schwimmende Trioleinhäutchen abgesogen und aus dem klaren Serum Cholesterin und Phosphorlipide wie später angegeben und aus dem restlichen ultrazentrifugierten Serum das Gesamteiweiß bestimmt.)

Das Triolein wird mit einem Glasstab im Zentrifugenglas durchmischt und nochmals 10 Min. bei etwa 3 000 Umdrehungen/min. zentrifugiert, wieder in Eis eingebettet und dann mittels einer Kapillare der sich unten noch befindende Serumrest abgesaugt. Um das Triolein zu pipettieren, nimmt man eine Pipette mit weiter Öffnung und erwärmt sie, nachdem man vorher auch das Zentrifugenglas und damit das feste kalte Triolein im heißen Wasserbad erwärmt und so flüssig gemacht hat. Dann werden wie oben angeführt 1 ccm zur Cholesterinbestimmung gefällt.

II. Extraktion mit Äther:

In ein dickwandiges Zentrifugenglas werden zu 4 ccm Serum 4 ccm Äther pipettiert und der Serum- und der Ätherstand markiert. Die Proben werden bei einer Frequenz von 128 mal/Min. in der Warburg-Apparatur geschüttelt. Nach je einer Std. werden die Gläser entnommen, scharf zentrifugiert, die Ätherschicht von 2 Zentrifugengläsern in 1 Veraschungsglas abgesaugt und erneut je 1 ccm Äther vorsichtig auf die Serumschicht gegeben und nach dem Schütteln wie voriges Mal wieder abgesaugt. So 3mal nach je 1 Std. Schütteln. Dann wird der Äther in den Veraschungsgläsern vollkommen verdampft und es werden zum Übriggebliebenen 10 ccm Petroläther gegeben. Davon entnimmt man 2mal 4 ccm zur Doppelbestimmung der Phosphorlipide und 2mal $1\frac{1}{2}$ ccm zur Bestimmung der Gesamtcholesterine.

Die Phosphorlipide werden dann nach BENOTTI (12) bestimmt.

Der Petroläther in den Reagenzgläsern zur Bestimmung der Gesamtcholesterine wird verdampft und der Rückstand in 2 ccm Eisessig evtl. unter Erwärmen gelöst. Nach kurzem Abkühlen werden in jedes Glas 2 ccm Farbreagens im Abstand von 1 Min. gegeben und wie im Folgenden angegeben bestimmt.

Bestimmung des gesamten, freien und veresterten Cholesterins.

Zur Anwendung kam eine etwas abgeänderte Methode nach SCHÖNHEIMER und SPERRY.

Grundgedanke: Das Cholesterin wird durch Aceton-Alkohol (1:1) extrahiert, in einem Teil das gesamte Cholesterin durch Verseifung freigemacht und anschließend mit Digitonin gefällt. In einem anderen Teil wird das freie Cholesterin ohne Vorbehandlung mit Digitonin gefällt. Dann wird das Cholesterin-Digitonid isoliert, in Eisessig gelöst und mit Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure die Liebermann-Burchardt'sche Farbreaktion erzeugt und photometrisch bestimmt.

Reagentien: Aceton-Alkohol 1:1 (96%iger Alkohol mit Benzin vergällt)
Digitoninlösung 1 000 mg (100 ccm 50%iger Alkohol)
10%ige Essigsäure
Aceton-Äther 1:2
50%ige KOH
Phenolphthalein
Eisessig (Acid. acet. glaciale)
Essigsäure-Anhydrid
Schwefelsäure p.p.A. $D = 1,84$

Extraktion: In einen 25 ccm Meßkolben gibt man etwa 15 ccm Aceton-Alkohol und tropfenweise 1 ccm Serum aus der Pipette hinzu. Zur besseren Eiweißausfällung kurz im Wasserbad sieden lassen und nach Abkühlen auf Marke 25 Aceton-Alkohol auffüllen. Dann wird durch ein Hartfilter (Schleicher Schüll 605 h) filtriert.

Verfahren: Vor dem Filtrat werden in je 2 Gläser (Doppelbestimmung) 3 ccm für das Gesamtcholesterin und in 2 weiteren Gläsern 7 ccm für das freie Cholesterin pipettiert. Es werden dickwandige Zentrifugengläser verwendet, da sonst durch das Rühren mit dem Glasstab der Boden herausgestoßen wird. Zu den 3 ccm des Filtrats werden 3 Tropfen 50%ige KOH gegeben und mit einem an den Enden abgeplatteten Glasstab innig vermischt (5 Minuten).

Die Gläser werden dann mit den Stäben für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wird auf 6 ccm mit Aceton-Alkohol verdünnt. Überschüssiges Alkali wird durch 10%ige

Essigsäure mit Phenolphthalein als Indikator neutralisiert.

Einen Tropfen Essigsäure im Überschuß geben, da die anschließende Fällung mit Digitonin im leicht sauren Milieu stattfinden muß. Ebenso wird in die Gläser für freies Cholesterin 1 Tropfen Essigsäure gegeben.

Jetzt wird in allen Gläsern mit Digitonin gefällt:

1/2 ccm Digitoninlösung pro ccm Untersuchungslösung, also 3 ccm für das gesamte, 3,5 ccm für das freie Cholesterin. Zur völligen Ausfällung bleiben die Gläser über Nacht stehen. Der an der Wand haftende Niederschlag wird am nächsten Morgen mit den entsprechenden Glasstäben, die, um eine Verwechslung zu vermeiden, in eine numerierte Aufhängevorrichtung gehängt werden, abgelöst. Die Gläser werden dann nach Entfernung der Glasstäbe bei 3 000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert.

Dann wird die überstehende Flüssigkeit mit einer feinen Kapillare an der Wasserstrahlpumpe bis auf etwa 1 ccm abgesaugt. Man gibt nun in jedes Glas 5 ccm Aceton-Äther (1:2) wirbelt energisch auf und zentrifugiert wieder. Nach erneutem Absaugen wiederholt man diesen Vorgang beim Gesamtcholesterin einmal und beim freien Cholesterin zweimal mit Äther pro analysi. Die letzten Ätherreste werden im Luftstrom abgedampft.

Farbreaktion: Der trockene Rückstand wird in 2 ccm Eisessig pro analysi evtl. unter Erwärmen auf 60° C gelöst. Nach Abkühlen werden in jedes Glas 2 ccm Farbreagens (Essigsäure + Schwefelsäure (D = 1,84) = 20:1. Das Farbreagens muß gerührt werden, bis keine Schlieren mehr zu erkennen sind!) im Abstand von 1 Minute pipettiert. Dann kommen die Gläser für genau 1 Std. (Stoppuhr) in die Dunkelkammer.

Ablesung: Genau 1 Stunde nach dem Einpipettieren des Farbreagenses wird im Photometer mit Filter Hg 578 abgelesen, für jede Ablesung ist eine Minute Zeit. Es wird gegen einen Nullwert abgelesen, der 2 ccm Eisessig und 2 ccm des Farbreagenses enthält.

Berechnung: Der Extinktionswert wird auf eine Eichkurve (s. u.) eingetragen und der Cholesterin-mg-Gehalt abgelesen.

$$\text{mg Gesamt} \quad \frac{100}{0,12} = \text{mg \% Gesamtcholesterin}$$

$$\text{mg Freies} \quad \frac{100}{0,28} = \text{mg \% freies Cholesterin}$$

Gesamtcholesterin - freies Cholesterin = Estercholesterin.

Zur Ausschaltung von Temperatureinflüssen werden jedesmal einige Proben von bekanntem Cholesteringehalt mitbestimmt und jedesmal wird so eine neue Eichung vorgenommen.

Errichtung einer Eichkurve zur colorimetrischen Bestimmung des Cholesterins im Photometer

Eine Cholesterinstammlösung (Cholester. puriss. Bayer) 100 mg/100 ccm Chloroform = 1 mg/ccm wird 1:10 mit Chloroform verdünnt. Hiervon wird in fortlaufend numerierten Zentrifugengläsern eine um je 1 ccm zunehmende Menge dieser Lösung genauest pipettiert. Das Chloroform wird im Wasserbad verdampft, das trockene Cholesterin wird in je 2 ccm Eisessig (acid. acet. glaciale) gelöst, evtl. unter leichtem Erwärmen bis auf 60° C.

Nach Abkühlen werden je 2 ccm des o. a. Farbreagenzes zugefügt. Dann werden die Gläser ins Dunkle gestellt und nach genau 60 Min. mit je 1 Minute Zeitabstand pro Glas wird im Photometer die Farbintensität gemessen. Als Vergleichswert dient eine Lösung der obigen Reagenzien (2 ccm Eisessig + 2 ccm des o. a. Farbreagenzes).

Es wird das Filter Hg 578 verwendet.

Beispiel: Glas	1	enthält	1 ccm Lösung	= 0,1 mg Cholesterin	= 0,0900
Glas	2	enthält	2 ccm Lösung	= 0,2 mg Cholesterin	= 0,1801
Glas	3	enthält	3 ccm Lösung	= 0,3 mg Cholesterin	= 0,2770
Glas	4	enthält	4 ccm Lösung	= 0,4 mg Cholesterin	= 0,3840
Glas	5	enthält	5 ccm Lösung	= 0,5 mg Cholesterin	= 0,467
Glas	6	enthält	6 ccm Lösung	= 0,6 mg Cholesterin	= 0,557
Glas	7	enthält	7 ccm Lösung	= 0,7 mg Cholesterin	= 0,648
Glas	8	enthält	8 ccm Lösung	= 0,8 mg Cholesterin	= 0,751
Glas	10	enthält	10 ccm Lösung	= 1,0 mg Cholesterin	= 0,93

Die abgelesenen Extinktionswerte werden auf Millimeterpapier eingetragen und untereinander verbunden. Die so erhaltene Eichkurve ermöglicht es, den Cholesteringehalt aus der Extinktion direkt abzulesen.

Photometrische Bestimmung der Phosphorlipide

Zur Verwendung gelangte die von BENOTTI (12) angegebene Methode zur Bestimmung von Phosphorlipoiden nach SCHMIDT, BENOTTI, HERSHMAN, THANNHAUSER: I.B.C. 166, 505 (1946).

Grundgedanke: Die Fette werden mit Alkohol-Äther extrahiert und durch Reextraktion mit Petroläther weiter gereinigt. Der organische Phosphor wird mit Schwefelsäure verascht. Ein aliquoter Teil der Lösung wird reduziert und der Phosphorgehalt photometrisch bestimmt (FISKE SUBBAROW).

Reagentien: Alkohol-Äther (Bloors Reagens) 3:1
Petroläther
5n H_2SO_4
Wasserstoffperoxyd 5 %
2,5 % Ammonium molybdat

Reduktionsmittel:

Natrium bisulfit	30,0 gr
Natrium sulfit	6,0 gr anhydric.
1 Amino 2 Naphthol 4 Sulfo-Säure	0,5 gr
Aqua dest. ad	250,0 ccm.

Verfahren: 2 ccm Serum mit 20 ccm Bloors Reagens (Alkohol-Äther 3:1) extrahieren, erhitzen und bis zur Marke des 50 ccm-Kölbchens auffüllen. Filtrieren und 40 ccm des Filtrats bis zur Trockenheit eindampfen. Den Rückstand mehrmals mit kleinen Mengen Petroläther extrahieren und in ein 10 ccm-Kölbchen filtrieren. Mit Petroläther bis zur Markierung auffüllen. Davon je 4 ccm in 2 große feuerfeste Reagenzgläser für 2 gleiche Analysen geben (Doppelbestimmung). Den Petroläther durch Erhitzen auf dem Wasserdampfbad verdampfen. Dann jeweils 2,5 ccm 5n H_2SO_4 hinzufügen, über freier Flamme veraschen und, wenn die Verkohlung einsetzt, abkühlen. Dann 5 Tropfen 10%igen Wasserstoffsuperoxyd hinzugeben. Das Veraschen unter Beigabe kleiner Mengen H_2O_2 und Erhitzen fortsetzen, bis eine klare Lösung resultiert. Diese Lösung wird als 1 ccm angenommen, 2,5 ccm Ammon. molybd. dazugegeben, dann wird aqua dest. bis auf 24 ccm also mit 20,5 ccm aufgefüllt und 1 ccm Reduktionsmittel hinzugefügt und der Phosphor photometrisch bestimmt. Es wird genau 10 Minuten nach dem Einpipettieren des Reduktionsmittels unter Verwendung des Filters

Hg 578 abgelesen. Der erhaltene Extinktionswert wird in die Eichkurve eingetragen und der mg-Phosphorwert abgelesen.

Berechnung: $\text{mg-P} \times \frac{10}{4} \times \frac{50}{40} \times \frac{100}{2} \times 25 = \text{mg \% Phosphorlipide.}$

Einrichtung einer Eichkurve zur colorimetrischen Bestimmung des Phosphors mit dem Photometer

Von einer Standard-Lösung die 2,0 mg P in 100 ccm H₂O = 0,02 mg/ccm enthält, wird analog der Cholesterinbestimmung in fortlaufend numerierten 25 ccm-Meßkölbchen 1 - 10 ccm Lösung pipettiert.

Dieser Lösung werden je 2,5 ccm 5n H₂SO₄ und 2,5 ccm Ammon. molybd.-Lösung 2,5 % und 1 ccm Reduktionsmittel zugegeben und auf 25 ccm mit aqua dest. aufgefüllt. Nach genau 10 Minuten nach Hinzugeben des Reduktionsmittels wird im Photometer die Farbintensität gemessen. Als Vergleichswert dient eine Lösung der oben verwendeten Reagentien (2,5 ccm H₂SO₄ + 2,5 ccm 2,5%ige Ammoniummolybdatlösung + 1 ccm Reduktionsmittel + aqua dest. ad 25,0). Es wird das Filter 578 Hg verwendet.

Glas 1	enthält	1 ccm Lösung	= 0,02 mg Phosphor	= 0,085
Glas 2	enthält	2 ccm Lösung	= 0,04 mg Phosphor	= 0,152
Glas 3	enthält	3 ccm Lösung	= 0,06 mg Phosphor	= 0,219
Glas 5	enthält	5 ccm Lösung	= 0,10 mg Phosphor	= 0,345
Glas 10	enthält	10 ccm Lösung	= 0,20 mg Phosphor	= 0,659

Die erhaltenen Extinktionswerte werden wieder auf Millimeterpapier eingetragen und untereinander verbunden.

Die Bestimmung des Gesamteiweißes

wurde freundlicherweise vom Hauptlabor der Med. Poliklinik durchgeführt.

ERGEBNISSE

Cholesterinbestimmungen

im Serum					im Triolein			
Freies		Gesamtes		Gesamt- eiweiß	Freies		Gesamtes	
absol.	%	absol.	%		absol.	%	absol.	%

1. Versuch:

Ausgswert: 84,9 mg%=100% 221,0 mg%=100%

Schüttlg.	1	53,3 = 62,8
	2	46,4 = 54,7
	3	35,4 = 41,6
	4	35,4 = 41,6
	5	43,8 = 51,6

2. Versuch:

Ausgswert: 86,0 mg%=100% 216,0 mg%=100%

Schüttlg.	1	58,8 = 68,4	145,0 = 69,4
	2	42,7 = 49,6	60,8 = 28,2
	3	40,3 = 46,9	26,6 = 12,3
	4	39,6 = 46,0	15,0 = 6,9
	5	46,7 = 54,3	11,7 = 5,4

3. Versuch:

Ausgswert: 84,9 mg%=100% 221,0 mg%=100%

Schüttlg.	1	66,0 = 77,8	145,0 = 65,6
	2	41,0 = 48,3	55,8 = 25,3
	3	40,3 = 47,5	21,3 = 9,6

4. Versuch:

Ausgswert: 95,6 mg%=100% 275,0 mg%=100% 7,6

Schüttlg.	1	56,1 = 58,7	130,0 = 47,3	7,6
	2	36,4 = 38,1	25,0 = 9,1	7,6
	3	28,6 = 29,9	25,0 = 9,1	7,55

5. Versuch:

Ausgswert: 115,0 mg%=100% 360,5 mg%=100% 7,81

Schüttlg.	1	71,2 = 61,9	166,5 = 46,1	7,8
	2	57,2 = 49,8	70,8 = 19,4	7,8
	3	39,3 = 34,2	38,3 = 10,6	7,8
	4	33,9 = 29,5	38,3 = 10,6	7,8

im Serum					im Triolein				
Freies		Gesamtes		Gesamt- eiweiß	Freies		Gesamtes		
absol.	%	absol.	%		absol.	%	absol.	%	
<u>6. Versuch:</u>									
Ausggwert: 75,4 mg%=100%		150,0 mg%=100%		6,90					
Schüttlg.	1	50,0 = 66,3	95,8 = 63,9	6,9	14,3 = 19,0	45,9 = 30,6			
	2	44,6 = 59,2	50,0 = 33,3	6,9	4,4 = 5,9	24,7 = 16,4			
	3	39,3 = 52,1	28,3 = 18,9	6,9	3,7 = 4,9	8,0 = 5,3			
	4	44,6 = 59,2	30,0 = 20,0	6,9					
<u>7. Versuch:</u>									
Ausggwert: 89,2 mg%=100%		155,7 mg%=100%		7,1					
Schüttlg.	1	59,6 = 66,8	91,6 = 58,8	7,1	27,8 = 31,1	47,8 = 30,7			
	2	57,2 = 64,1	62,4 = 40,1	7,1	23,1 = 25,9	17,1 = 10,9			
	3	55,2 = 61,9	62,4 = 40,1	7,1	13,3 = 16,0	4,3 = 2,7			
	4	53,6 = 60,0	58,1 = 37,3	7,1	0,6 = 0,4				
<u>8. Versuch:</u>									
Ausggwert: 81,4 mg%=100%		143,0 mg%=100%							
Schüttlg.	1	75,0 = 92,1	125,0 = 87,4	4,54	26,8 = 32,9	48,8 = 27,2			
	2	61,4 = 75,4	66,6 = 46,6	4,46	20,9 = 25,7	1,7 = 1,1			
	3	51,8 = 42,4	33,3 = 23,3						
<u>9. Versuch:</u>									
Ausggwert: 102,5 mg%=100%		296,0 mg%=100%							
Schüttlg.	1	81,0 = 79,0	250,0 = 84,4	35,3 = 34,8		37,5 = 12,7			
	2	66,1 = 64,5	218,1 = 73,7	18,1 = 17,9		174,9 = 59,1			
	3	53,1 = 51,8	200,0 = 67,6	12,0 = 11,9		41,7 = 14,1			
	4	53,1 = 51,8	95,8 = 32,0						
<u>10. Versuch:</u>									
Ausggwert: 108,5 mg%=100%		321,0 mg%=100%							
Schüttlg.	1	90,3 = 83,2	265,0 = 82,5	36,7 = 33,8		91,7 = 28,5			
	2	79,0 = 72,8	212,0 = 66,0	18,1 = 17,9		22,5 = 7,0			
	3	72,1 = 66,5	193,0 = 60,1	12,0 = 11,9		20,9 = 6,5			
	4	61,2 = 56,4	179,0 = 55,8						

		im Serum		im Triolein	
		absol.	%	absol.	%
<u>1. Versuch:</u>					
Ausggwert:		171,4 mg ^o %=100 %			
Schüttlg.	1	168,0 = 98,0			
	2	165,0 = 96,3			
	3	125,0 = 73,5			
	4	39,1 = 22,8			
	5	27,4 = 15,9			
<u>2. Versuch:</u>					
Ausggwert:		171,4 mg ^o %=100 ^o %			
Schüttlg.	1	154,4 = 90,1			
	2	144,6 = 84,3			
	3	113,4 = 66,2			
	4	39,1 = 22,8			
	5	23,4 = 13,6			
<u>3. Versuch:</u>					
Ausggwert:		171,4 mg ^o %=100 ^o %			
Schüttlg.	1	161,0 = 93,9			
	2	135,0 = 78,7			
	3	86,0 = 50,2			
<u>4. Versuch:</u>					
Ausggwert:		213,0 mg ^o %=100 ^o %			
Schüttlg.	1	127,8 = 60,0			
	2	56,3 = 26,5			
	3	29,3 = 13,8			
<u>5. Versuch:</u>					
Ausggwert:		240,1 mg ^o %=100 ^o %			
Schüttlg.	1	164,2 = 64,0			
	2	125,8 = 51,9			
	3	95,2 = 39,5			
	4	71,4 = 29,7			

		im Serum		im Triolein	
		absol.	%	absol.	%
<u>6. Versuch:</u>					
Ausggwert:		170,0 mg ^g %=100%			
Schüttlg.	1	107,0 = 63,0			
	2	78,2 = 46,0			
	3	63,0 = 37,1			
	4	63,0 = 37,1			
<u>7. Versuch:</u>					
Ausggwert:		152,5 mg ^g %=100%			
Schüttlg.	1	133,0 = 87,1			
	2	90,0 = 59,0			
	3	62,3 = 40,9			
	4	32,8 = 21,5			
<u>8. Versuch:</u>					
Ausggwert:		144,7 mg ^g %=100%			
Schüttlg.	1	121,0 = 83,3			
	2	97,6 = 67,4			
	3	82,1 = 56,7			
	4	43,0 = 29,7			
<u>9. Versuch:</u>					
Ausggwert:		119,2 mg ^g %=100%			
Schüttlg.	1	104,4 = 87,2			
	2	68,4 = 57,0			
	3	50,8 = 42,7			
	4	34,8 = 29,2			
<u>10. Versuch:</u>					
Ausggwert:		119,2 mg ^g %=100%			
Schüttlg.	1	95,8 = 82,0			
	2	58,3 = 49,0			
	3	54,8 = 46,0			
	4	39,1 = 32,7			

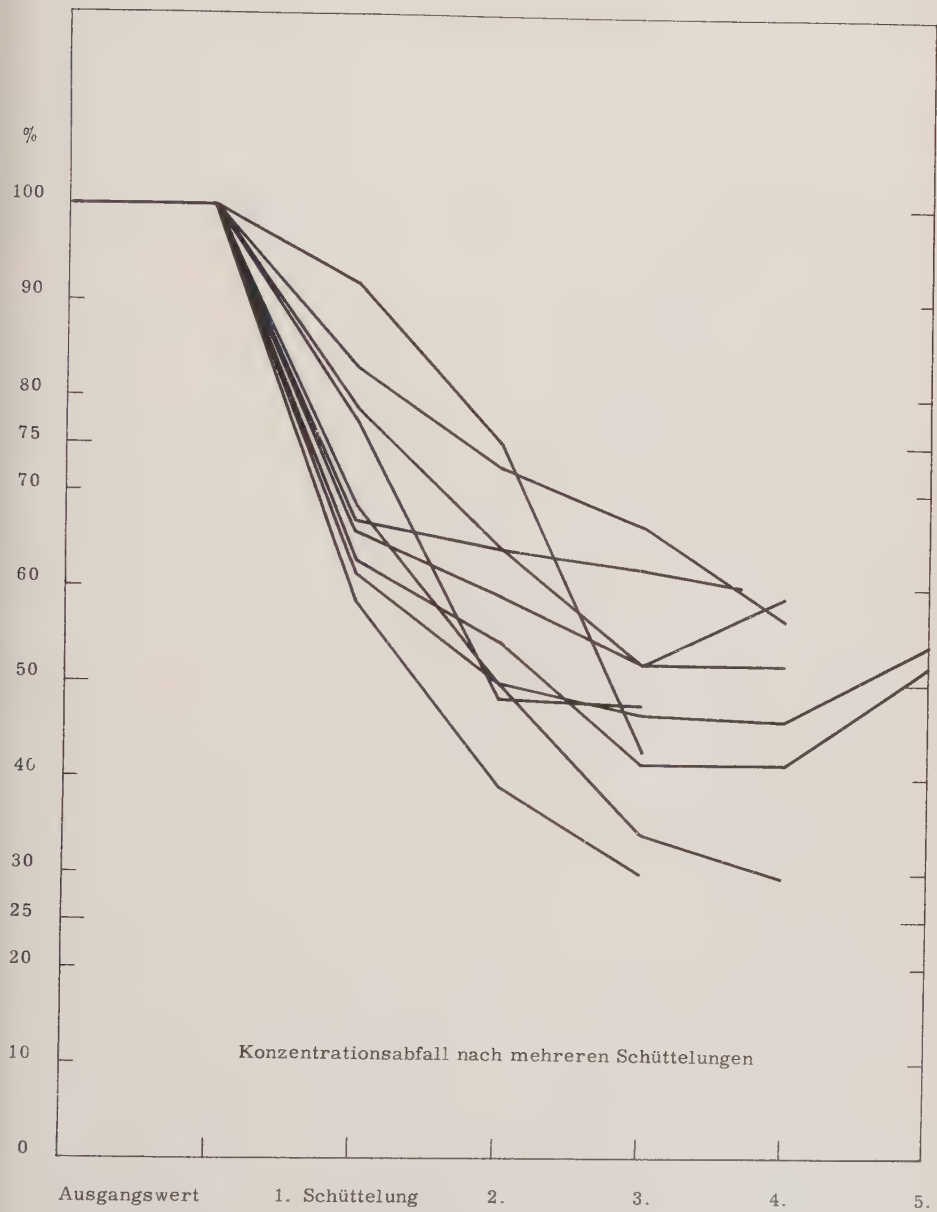
Cholesterinbestimmung

	im Serum		im Äther	
	absol.	%	absol.	%
Ausgangswert:	15,47 mg = 100 %			
nach der 1. Stunde			9,50 mg =	61,4 %
nach der 2. Stunde			2,46 mg =	15,9 %
nach der 3. Stunde			0,90 mg =	5,8 %
Restgehalt:	1,33 mg = 8,6 %			
	14,14 mg =	91,4 %	12,86 mg =	83,1 %

Lipoidphosphorbestimmung

	im Serum	im Äther
Ausgangswert:	10,55 mg = 100 %	
nach der 1. Stunde		0,00206
nach der 2. Stunde		0,01470
nach der 3. Stunde		0,04600
<u>Restgehalt:</u>	10,10	
	0,45	0,0628

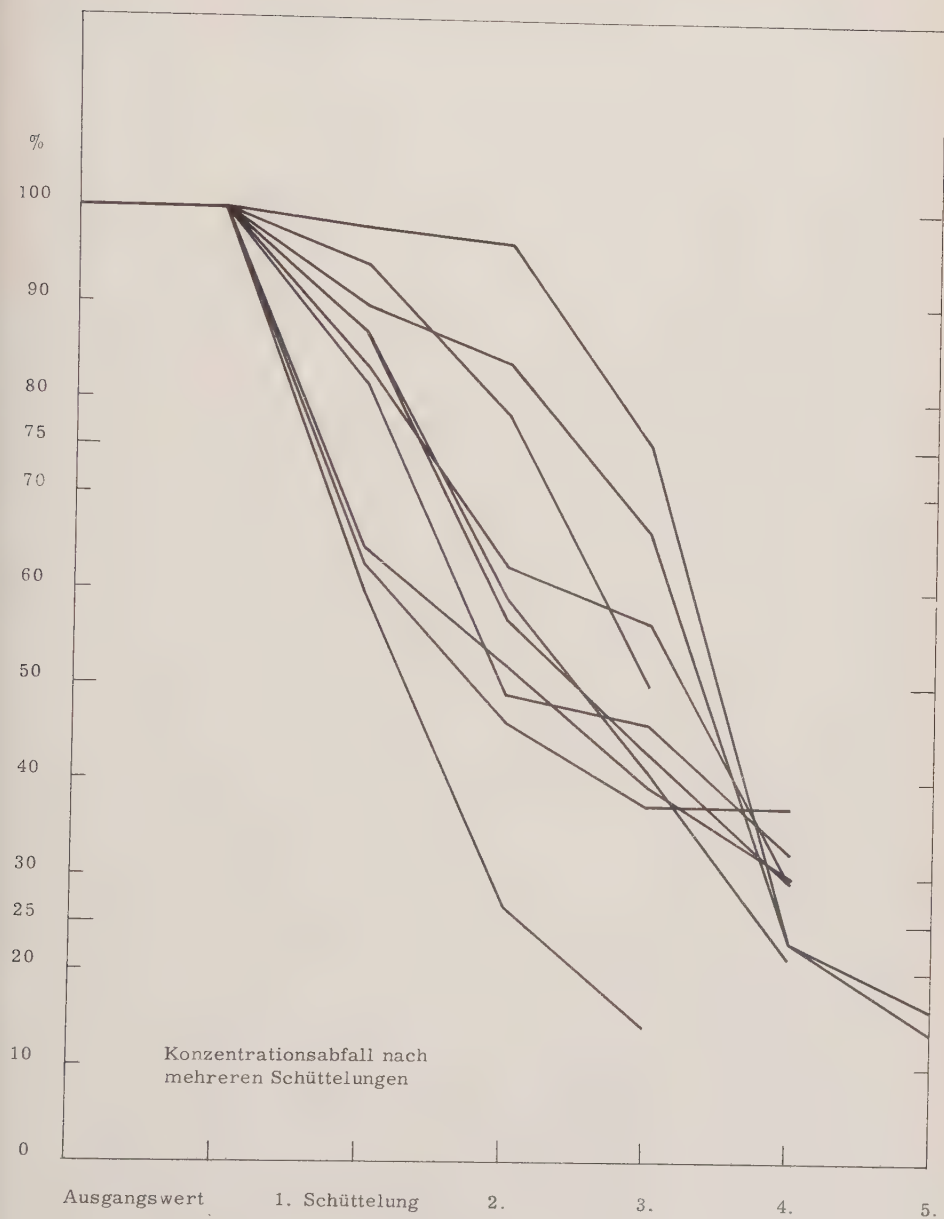
Freies Cholesterin im Serum

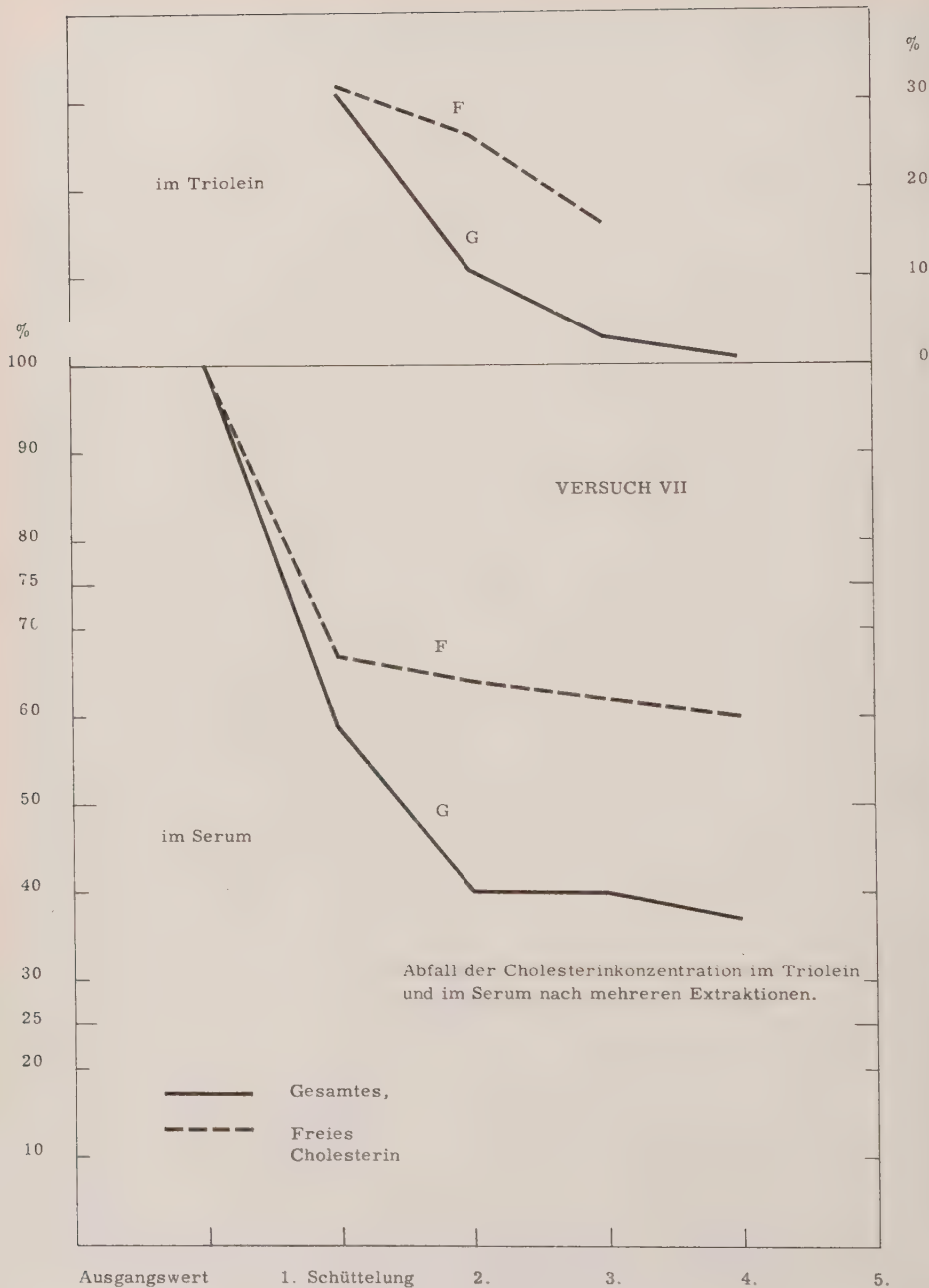


2

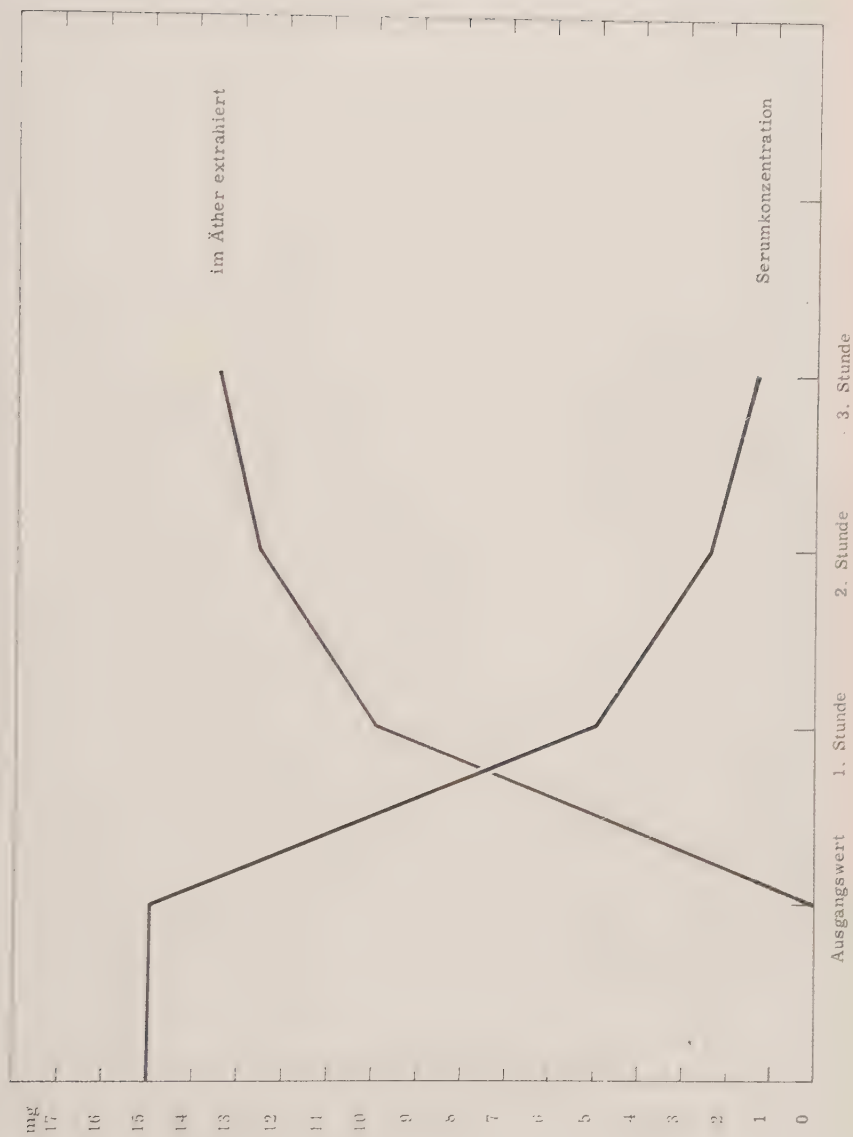


Phosphorlipide im Serum

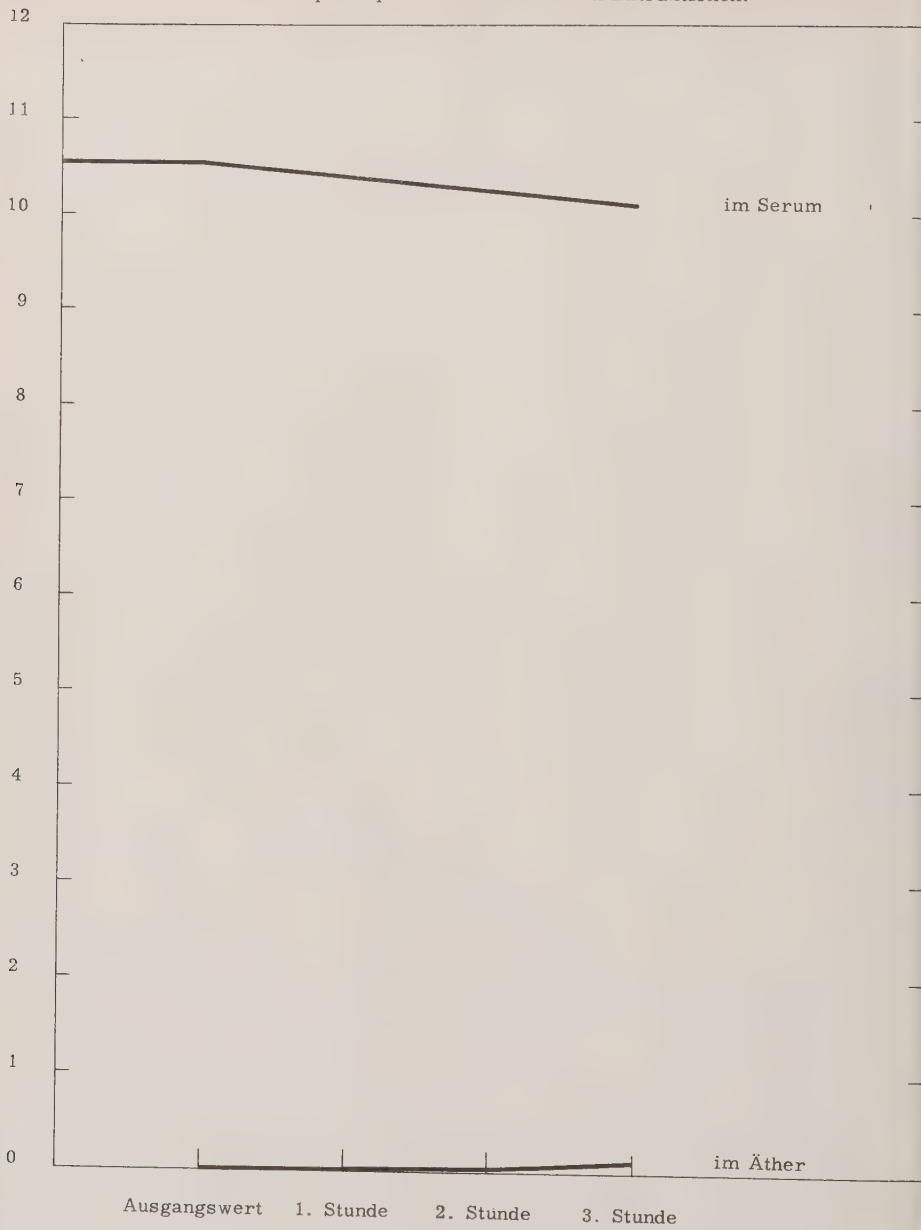




Der Abfall der Cholesterinkonzentration im Serum
und die Zunahme im Äther nach mehreren Extraktionen.



mg
an Phosphorlipiden nach mehreren Extraktionen.



AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Im Laufe der Versuche hat sich gezeigt, daß der Cholesterin- und Phosphorlipidgehalt infolge einer starken Durchmischung des Serums mit indifferenten, Eiweiß nicht denaturierenden Lösungsmitteln, mit einem physiologischen, also mit Triolein oder mit einem unphysiologischen, z. B. mit Äther im Serum abnimmt und im Lösungsmittel nachweisbar wird. Das Serumcholesterin war bereits bei der 4. Ausschüttelung nahezu quantitativ extrahiert. Die Phosphorlipide gingen anfangs nicht so schnell in das Lösungsmittel, was sich aber nach intensiverer Durchmischung beider Phasen änderte. Wesentlich ist, daß das Gesamteiweiß des Serums durch die Trioleinbehandlung keine Veränderung erfährt, also weder eine Denaturierung der Serumproteine stattfindet, noch eine Extraktion von Lipoproteinen en bloc.

Die Ergebnisse dieser Versuche machen es sehr wahrscheinlich, daß die "Bindung" von Cholesterin in den Lipoproteinen rein physikalisch zustande kommt, da es durch intensive Durchmischung des Serums mit den Fettlösungsmitteln Äther und dem noch indifferenten nichtpolaren Triolein herausgelöst und bei genügend oft wiederholter Ausschüttelung sogar quantitativ extrahiert werden konnte. In diesen Versuchen blieb der Quotient der Cholesterinkonzentration in Triolein und Serum von Extraktion zu Extraktion annähernd konstant. Wahrscheinlich liegt der Extrahierbarkeit ein reiner Verteilungsvorgang zugrunde (34), der, wenn man die Löslichkeit der Lipide ineinander (35) in Betracht zieht, mit dem Herauslösen des Cholesterins aus den Phosphorlipiden durch Übergehen in ein anderes lipophiles Lösungsmittel zu erklären ist. Daß auch die Phosphorlipide durch das nichtpolare Triolein oder Äther quantitativ extrahiert werden können, ist nicht zu erwarten, da Phosphorlipide selbst aus Chloroform teilweise in Wasser übergehen (36). Es erscheint jedoch wahrscheinlich, daß die Phosphorlipide fester an den Plasma-proteinen haften, als das Cholesterin (das wahrscheinlich in den Phosphorlipiden nur gelöst ist). Vermutlich werden an Proteinen zunächst Phosphorlipide festgehalten, sei es durch elektrostatische Kräfte, durch Löslichkeitsphänomene oder nur durch van der Waal'sche Kräfte. In den Fettsäurerest der Phosphorlipide dürfen dann die nichtpolaren Lipide, vor allem das Cholesterin, in Lösung gehen.

Der Zweck der vorliegenden Versuche war es, eine Hypothese über den Aufbau der Lipoprotein-Aggregate im Plasma zu finden. Die Hypothese GOFMANN's (37), daß es sich bei den Lipoproteinen um Moleküle (giant molecules), also um echte chemische Bindungen handle, ist unwahrscheinlich, da viele gesicherte Befunde dem widersprechen, auch wenn man den Begriff des Moleküls in der Eiweißchemie lockerer definiert.

Für die These GOFMANN's sprachen vor allem Beobachtungen, daß Serumlipoide nur nach vorheriger Eiweißdenaturierung durch Äther oder andere nichtpolare Lösungsmittel von verschiedenen Autoren (38, 39) quantitativ extrahiert werden konnten, daß eine etwaige Übereinstimmung zwischen den COHN'schen Lipoproteinen (32, 33, 40) und den elektrophoretisch gewonnenen Lipoidfraktionen (41) bestand und daß bei Ultrazentrifugierung (42) unter geeigneten Bedingungen einigermaßen einheitliche Lipoproteine abgetrennt werden konnten. Allerdings mit den klassischen chemischen Methoden, Kristallisation etc., ist nie die Feststellung der Einheitlichkeit einer Lipoidfraktion gelungen, obwohl sowohl Lipide als auch Proteine in kristallinem Zustand gewonnen werden können. In letzter Zeit wurden sogar Anhaltspunkte dafür entdeckt, daß eine echte chemische Bindung zwischen Protein und Lipoid nicht vorliegt, so z. B. die Befunde von MAURER und MÜLLER (31), daß mit ^{32}P in vivo markierte Phosphorlipide von Kaninchen und Ratten bei der Papierelektrophorese mit α_1 - und β -Globulinen und, wenn das Papier mit Serum getränkt wird, auch mit den Albuminen wandern können. Die Beschleunigung des Transports ist wahrscheinlich auf die Bindung der Phosphorlipide an andere Proteine zurückzuführen, zumal das Milieu eiweißreicher geworden ist. In die gleiche Richtung wiesen Versuche mit ^{14}C -markiertem Acetat (43), wonach nach der Cholesterin-Synthese (in der Leber) zuerst eine Cholesterinzunahme im Plasma nach 2 - 4 Stunden und dann bereits nach 8 - 12 Stunden ein Zuwachs in den Erythrozyten zu verzeichnen war. Das wird verständlich, wenn man noch folgenden Versuch mitbetrachtet. So zeigten Untersuchungen von normaler und arteriosklerotischer Intima von KAYAHAN (44), daß der Durchschnittsgehalt an Globulinen von 1 g normaler und 1 g arteriosklerotischer Intima gleich ist und nur das Lipidbindungsvermögen der arteriosklerotischen Intima erhöht ist. Also müssen die Lipide durch die Intimaglobuline infolge ihres erhöhten Lipidbindungsvermögens von den Serumglobulinen weggezogen werden können.

FLORSHEIM und MORTON (45) stellen sich ein Lipoprotein als einen Komplex vor, der einerseits aus einem Protein und andererseits aus einer Micelle gemischt aus Cholesterin, Cholesterinestern, Neutralfetten, Phosphorlipiden und Fettsäuren besteht. Der Komplex wird ihrer Ansicht nach durch elektrostatische Kräfte zusammengehalten. Jedoch sind die Autoren selbst der Ansicht, daß nicht alle Be-

funde aus der Biochemie der Serumlipide und Lipoproteine damit erklärbar sind.

Nach FREDRICKSON D.S. (46) wird u. a. vermutet, daß Lipoproteide Makromoleküle und zwar große aus Cholesterin und Phosphorlipiden aufgebaute Kugeln sind, die teilweise ein dünner Film von Protein umgibt. Die Lipoproteinanteile seien möglicherweise miteinander und mit dem Protein durch van der Waal'sche Kräfte verbunden. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Struktur sei Wasser. Dehydrierung vernichte die Stabilität des Moleküls.

Die wahrscheinlichste Bindungsart ist eine Aggregatbildung zwischen Lipiden und Proteinen. Gegen diese Hypothese sprachen vor allem frühere Befunde, so von MACHEBOEUF und Mc. FARLANE (38), denen es nicht gelang, mit Hilfe von Äther Cholesterin aus dem Serum zu lösen. Neuere Autoren, wie CHARONNAT R. (47), DELSAL J. L., PEREZ J., LAPORTE R. (48) konnten Cholesterin mit Hilfe von Äther dann teilweise extrahieren und LEVER W. F., SMITH P.A.J., HURLEY N. A. (49) und ZÖLLNER N. (34) gelang dann die quantitative Extraktion mit Äther, dem Letztgenannten auch mit Hilfe eines wie oben erwähnt noch indifferenten nichtpolaren Fettlösungsmittels, nämlich mit Triolein, was ich voll bestätigen konnte. Die quantitative Extraktion gelingt ohne Verluste im Gesamteiweißgehalt des Serums, wenn man den Vorgang oft genug wiederholt.

LEVER und seine Mitarbeiter konnten allerdings nicht auch die Phosphorlipide quantitativ extrahieren. Dies fanden ZÖLLNER N., FRINGS H. D. und ich anfangs auch, jedoch wurden, nachdem der mechanische Durchmischungsvorgang des Serums mit dem Lösungsmittel verstärkt wurde, die Phosphorlipide beinahe in demselben Maße extrahierbar, wie das Cholesterin.

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der Versuchsergebnisse scheinen die Lipoproteine sehr lockere Verbindungen, "Aggregate", zu sein, die durch elektrostatische Kräfte, durch Gelöstsein oder durch von der Waal'sche Kräfte zustandekommen. Man kann sich das Lipoproteinmodell so vorstellen, daß an einem Proteinkern durch oben erwähnte Kräfte Phosphorlipide angelagert bzw. adsorbiert sind. Durch den lipophilen Anteil der Phosphorlipide werden dann Cholesterin, Neutralfette und die selteneren Lipide in Lösung gehalten. Wahrscheinlich entstehen diese Aggregate, sobald Lipide und Proteine im Plasma zusammenkommen. Zu denken wäre auch an eine Art Gleichgewicht zwischen an den Proteinkern angelagerten und frei im Serum noch ohne Hilfe des Proteins löslichen Lipiden.

Quantitativ nicht ins Gewicht fallende Lipoproteine, in denen die Bindung zwischen Protein und Phosphorlipoid kovalent erfolgt, sind jedoch nicht ausgeschlossen. Man müßte dann an peptidartige Bindungen zwischen Aminosäuren und den Basen der Phosphorlipoide denken.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Professor Dr. med. W. SEITZ meinen aufrichtigen Dank für die Übernahme des Correferates auszusprechen.

Herrn Privatdozent Dr. med. N. ZÖLLNER möchte ich herzlich danken für die Überlassung des Themas, für die mir gewährte freundliche Unterstützung bei der Ausarbeitung und für die Übernahme des Referates.

Zu großem Dank bin ich Herrn Dr. med. H. D. FRINGS für die wertvolle Hilfe und für die guten Ratschläge bei meinen Versuchen verpflichtet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Celmer W. D. Physiol. Rev. 32, 167 (1952)
Carter H. E.
2. Zöllner N. Thannhauser's Lehrbuch des Stoffwechsels und der
 Stoffwechselkrankheiten S. 651 (1957)
3. Eckles N. E. J. Laborat. Clin. Med. 46, 359 - 371 (1955)
 Taylor C. B.
 Campbell D. J.
 Gould R. G.
4. Grossi E. Arch. int. Physiol. 66, 564 - 572 (1958)
 Paoletti P.
 Paoletti R.
5. Zöllner N. Thannhauser's Lehrbuch des Stoffwechsels und
 der Stoffwechselkrankheiten S. 658 (1957)
6. Daniel L. Azarnoff I. nat. Cancer Inst. 21, 1109 - 1115 (1958)
 George L. Curran
 William P. Williamson
7. O'Donnel I. J. Canad. J. Biochem. 36, 1125 - 1136 (1958)
 Ottolenghi P.
 Malkin A.
 Denstedt O. F.
 Heard R. D.
8. Sonderhoff R. Liebig's Ann. Chem. 530 (1937), 195
 Thomas H.
9. Langdon R. G. J. Amer. Chem. Soc. 74, 1869 (1952)
 Block K.
10. Zöllner, N. Thannhauser's Lehrbuch des Stoffwechsels und der
 Stoffwechselkrankheiten S. 659 (1957)
11. Lynen F. Angew. Chemie 70, 738 - 742 (1958)
 Egger H.
 Henning U.
 Kessel Ingrid

12. Benotti I. Clinical Chemistry Methode,
Boston Mass. (1948)
13. Rossi B. Amer. Heart J. 53, 277 - 283 (1957)
Rulli V.
14. Tschimakadse G. N. Pharmakol. und Toxikol. (russ.)
17, Nr. 3, 11 (1954)
15. Altschul R. Anat. Rec. 133, 357 - 358 (1959)
16. Galbraith P. A. Lancet, Nr. 7066, I : 222 - 223 (1959)
Perry W. F.
Breamish R. E.
17. Whitehouse M. W. J. biol. Chem. 234, 276 - 281 (1959)
Steaple E.
Gurin S.
18. Parpart A. K. In Modern Trends in Physiology and Biochemistry
Ballentine R. S. 135 New York (1959)
19. Schrade W. Dtsch. Med. Wschr. 81, 617 - 621 (1956)
20. Friedkin M. J. Biol. Chem. 177, 775 (1949)
Lehninger A. L.
21. Zöllner N. Thannhauser's Lehrbuch des Stoffwechsels und der
Stoffwechselkrankheiten S. 628 (1957)
22. Artom C. Formation of Phospholipids in Animal Tissue.
In Phosphorus Metabolism 2. Bd. Baltimore (1952)

Artom C. J. Biol. Chem. 180, 495 (1949)
Cornatzer W. E.
Crowder M.
23. Popjak G. Biochem. J. 46, 103 (1949)
Muir H.
24. Snyder F. Nature (Lond.) 182, 462 (1958)
Cornatzer W. E.
25. Zöllner, N. Thannhauser's Lehrbuch des Stoffwechsels und der
Stoffwechselkrankheiten S. 634 (1957)
26. Schettler G. Handbuch d. inn. Med., Bd. 7, 2. Teil
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955

- Thannhauser S. J. Lipidoses, Diseases of Cellular Lipid Metabolism,
New York (1950)
27. Peters J. P. Quantitative Clinical Chemistry.
 van Slyke D. D. Interpretations, Bd. 1 S. 431
 Baltimore 1946
28. Zöllner N. Verh. der Dtsch. Gesellsch. Inn. Med.
 64, 153 (1958)
29. Jackson R. S. Ann. Int. Med. 37, 1162 (1952)
 Wilkinson C. F. jr.
30. Bragdon J. G. J. Labor. Clin. Med. 48, 36 (1956)
 Havel R. J.
 Boyle E.
31. Maurer W. Biochem. Zschr. 324, 255 (1953)
 Müller E. R.
32. Edsall J. T. The Plasma Proteins and their Fractionation.
 (Advances Protein Chem. 3, 383 (1947)
33. Oncley J. L. J. Phys. Colloid. Chem. 51, 184 (1947)
 Scatchard G.
 Brown A.
34. Zöllner N. Verh. Dtsch. Gesellschaft Inn. Med. 63, 631 (1957)
35. Zöllner N. Verh. Dtsch. Gesellschaft Inn. Med. 64, 155 (1958)
36. Zöllner N. Verh. Dtsch. Gesellschaft Inn. Med. 63, 633 (1957)
37. Gofman J. Science 111, 166 (1950)
 Lindgren F.
 Elliot H.
 Mantz W.
 Hewitt J.
 Strisower B.
 Herring V.
38. Mc. Farlane A. S. Nature, London 149, 439 (1942)
39. Macheboeuf M. Bull. Soc. Chim. biol. 11, 268 (1929)
40. Cohn E. J. J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950)
 Gurd F. R. N.
 Surgenor D. M.

Barnes B. A.
Brown R. K.
Derouaux G.
Gillespie J. M.
Kahnt F. W.
Lever W. F.
Liu C. H.
Mittleman J.
Mouton R. F.
Schmid K.
Uroma E.

41. Blix G. J. Biol. Chem. 137, 485 (1941)
Tiselius A.
Svensson H.
42. Pedersen K. O. Ultracentrifugal Studies on Serum and Serum
Fraktions (Uppsala) 1945
J. Phys. Chem. 51, 156 (1947)
43. Gould R. G. J. Laborat. Clin. Med. Bd. 46 Nr. 3 (1955)
Le Roy G. V.
Okita G. T.
Kabara J. J.
Keegan P.
Bergental D. M.
44. Kayahan S. Lancet, Nr. 7066, I : 223 - 224 (1959)
45. Florsheim W. H. J. Appl. Physiol. 10, 301 - 304 (1957).
46. Fredrickson D. S. J. Amer. med. Ass. 164, 1895 - 1899 (1957)
47. Charronat R. J. pharmacie chim. 23, 307 (1936)
48. Delsal J. L. First Internat. Congr. Biochem.,
Perez J. Cambridge (1949) 482
Laporte R.
49. Lever W. F. J. Invest. Dermat. 22, 53 (1954)
Smith P. A. J.
Hurley N. A.

LEBENS LAUF

Am 26. August 1934 wurde ich als Sohn des Bankiers Michael Strehle und seiner Ehefrau Rosa, geborene Schmucker, in München geboren.

Am 1. September 1941 trat ich in die 1. Klasse Volksschule und am 13. November 1945 in die 1. Klasse der Oberschule Günzburg ein. Im Juni 1953 bestand ich das Abitur des humanistischen Gymnasiums. Im November des gleichen Jahres begann ich an der Universität München mit dem Studium der Medizin. Im Februar 1956 starb mein Vater. Im gleichen Monat bestand ich in München das Physikum. Die nächsten beiden Semester studierte ich in Freiburg und kehrte zum Sommersemester wieder nach München zurück, wo ich im Frühjahr 1959 das medizinische Staatsexamen ablegte.

